



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06312925 A**(43) Date of publication of application: **08.11.94**

(51) Int. Cl **A61K 31/37**  
**C07D311/16**

(21) Application number: **05351659**(22) Date of filing: **27.12.93**(30) Priority: **02.03.93 JP 05 66164**(71) Applicant: **KUREHA CHEM IND CO LTD**

(72) Inventor: **WATANABE TAKATOSHI**  
**NIIMURA KOICHI**  
**UMEKAWA KIYONORI**

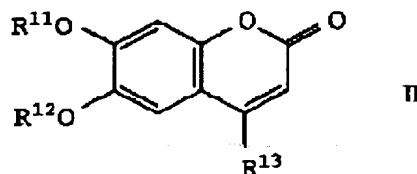
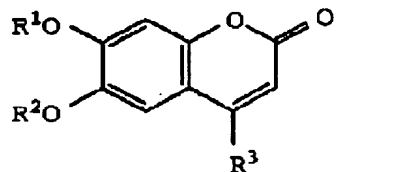
(54) **CARTILAGE-PROTECTION AGENT AND NEW**  
**ESCULETIN DERIVATIVE**

## (57) Abstract:

PURPOSE: To provide partly new esculetin derivatives effective for suppressing the destruction of articular cartilage, having low toxicity and useful as a cartilage-protection agent for the treatment of rheumatoid arthritis, arthrosis deformans, scapulohumeral periarthritis, etc.

CONSTITUTION: A cartilage-protection agent containing a compound expressed by formula I ( $R^1$  and  $R^2$  are H, 2-25C saturated or unsaturated aliphatic acyl or benzoyl;  $R^3$  is H or alkyl). The compounds of formula II ( $R^{11}$  and  $R^{12}$  are H, pivaloyl, capryloyl, lauroyl, palmitoyl, stearoyl, linoleoyl, docosahexaenoyl or benzoyl;  $R^{13}$  is H or methyl) (e.g. esculetin-6-monopivalate) are new compounds in the compounds of formula I. Various carboxylic acid mono or diesters of esculetin or 4-alkylesculetin can be produced e.g. by reacting esculetin or 4-alkylesculetin with various carboxylic acids in the presence of an acid catalyst.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-312925

(43)公開日 平成6年(1994)11月8日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/37	A B J	7431-4C		
C 0 7 D 311/16	I 0 1	9360-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 10 頁)

(21)出願番号	特願平5-351659	(71)出願人	000001100 呉羽化学工業株式会社 東京都中央区日本橋堀留町1丁目9番11号
(22)出願日	平成5年(1993)12月27日	(72)発明者	渡辺 孝寿 埼玉県坂戸市鶴舞2-5-7
(31)優先権主張番号	特願平5-66164	(72)発明者	新村 浩一 埼玉県蕨市中央1-17-30 ルネ蕨1-718
(32)優先日	平5(1993)3月2日	(72)発明者	梅川 清則 千葉県浦安市美浜5-4-309
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(74)代理人	弁理士 森田 憲一

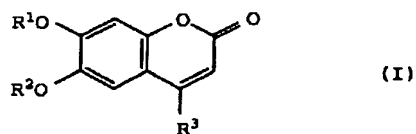
(54)【発明の名称】 軟骨保護剤及び新規エスクレチン誘導体

(57)【要約】

【目的】 軟骨保護剤及び新規エスクレチン誘導体を提供する。

【構成】 軟骨保護剤は下記一般式 (I) の化合物を含む。

【化1】



(R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は独立に、H、炭素数2～25の飽和又は不飽和脂肪族アシル、ベンゾイル；R<sup>3</sup> はH、アルキル。) エスクレチン誘導体は、一般式 (I) でR<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> が独立に、H、ピパロイル、カプリロイル、ラウロイル、パルミトイル、ステアロイル、リノールオイル、ドコサヘキサエノイル、ベンゾイル；R<sup>3</sup> がH、メチルの化合物。

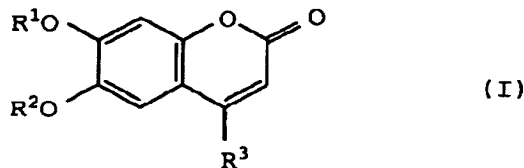
【効果】 一般式 (I) の化合物は、軟骨マトリックスを構成するGAGの減少を強く抑制し、軟骨保護作用を

示し、低毒性である。従って、軟骨保護剤として、慢性関節リウマチ、変形性関節症、肩関節周囲炎、頸肩腕症候群、腰痛症等の関節症の治療に極めて有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式 (I) :

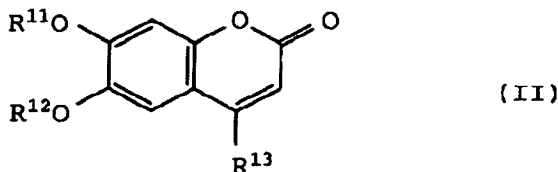
【化1】



(式中、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> はそれぞれ独立に、水素原子、炭素数 2～25 個の飽和若しくは不飽和脂肪族アシル基又はベンゾイル基であり、R<sup>3</sup> は水素原子又はアルキル基である) で表される化合物を含有することを特徴とする、軟骨保護剤。

【請求項2】 一般式 (II) :

【化2】



(式中、R<sup>11</sup> 及び R<sup>12</sup> はそれぞれ独立に、水素原子、ピバロイル基、カプリロイル基、ラウロイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、リノレオイル基、ドコサヘキサエノイル基、又はベンゾイル基であり、R<sup>13</sup> は、水素原子又はメチル基である) で表される化合物。

【請求項3】 R<sup>11</sup> 及び R<sup>12</sup> はそれぞれ独立に、水素原子、ピバロイル基、ステアロイル基、又はベンゾイル基であり、R<sup>13</sup> は、水素原子又はメチル基である請求項2に記載の化合物。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、軟骨保護剤及び新規エスクレチン誘導体に関する。詳しくは、下記の一般式

(I) で表される化合物を有効成分として含有する軟骨保護剤、及び下記一般式 (I) で表される化合物に属する下記一般式 (II) で表される化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】関節症には、慢性関節リウマチ、リウマチ熱、変形性関節症等がある。中でも慢性関節リウマチ及び変形性関節症は患者数が多く、主要な関節症と考えられている。変形性関節症には、先天性のもの或いは二次性のものと、老化による関節軟骨の退行変性による一次性のものがある。一次性の変形性関節症は、近年高齢者人口の増大につれて増加している。慢性関節リウマチと変形性関節症では、病因、病態に大きな違いがある。しかし何れも最終的には、軟骨破壊により関節機能が障害される点では共通している。慢性関節リウマチ、リウマチ熱、全身性エリテマトーデス、変形性関節症等のリ

(2)

ウマチ性疾患に対する第一選択薬は、アスピリン、インドメタシン等の鎮痛抗炎症剤である。慢性関節症治療薬としては、他にシオゾール等の金製剤、免疫調節剤、ステロイド剤、D-ペニシラミン等が使用される。下記の一般式 (I) で表される化合物は、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup> 及び R<sup>3</sup> が共に水素原子である場合にはエスクレチンである。

又、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> が共に水素原子であり、R<sup>3</sup> がメチル基である場合には、4-メチルエスクレチンである。これらのエスクレチン類はコレステロール低下、血管補強、及び抗酸化作用を有することが知られている(特公昭42-16626号公報)。4-メチルエスクレチンの炭素数6～25のカルボン酸のジエステル、特にカプリル酸ジエステル、ラウリン酸ジエステル、及びパルミチン酸ジエステルは皮膚疾患治療に有用な抗炎症作用を有することが知られている(FR 2276819)。

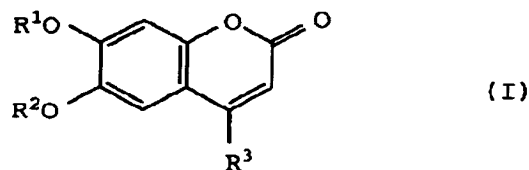
【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、下記の一般式 (I) の化合物が、軟骨保護剤として有用であることは知られていない。又、従来の上記鎮痛抗炎症剤は、関節軟骨の破壊には効果がなく、軟骨細胞を用いた実験においては、逆に、増悪する場合もある。更に、上記慢性関節症治療薬にも、関節軟骨の破壊抑制作用は見いだされていない。本発明者等は、関節軟骨の破壊を抑制する軟骨保護剤を開発すべく鋭意研究を行った結果、下記の一般式 (I) で表される化合物が、軟骨マトリックスを構成するグリコサミノグリカン(以下GAGと記す)の減少を強く抑制することを見出した。又、下記の一般式 (I) で表される化合物のうち、下記の一般式 (II) で表される化合物は新規化合物である。

30 【0004】

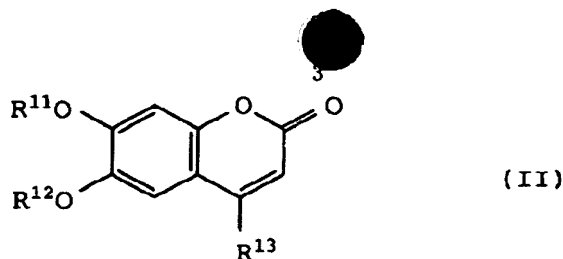
【課題を解決するための手段】従って、本発明は、一般式 (I) :

【化3】



(式中、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> はそれぞれ独立に、水素原子、炭素数 2～25 個の飽和若しくは不飽和脂肪族アシル基又はベンゾイル基であり、R<sup>3</sup> は水素原子又はアルキル基である) で表される化合物〔以下、本物質 (I) と記す〕を含有することを特徴とする、軟骨保護剤に関する。更に、本発明は一般式 (II) :

【化4】



(式中、R<sup>11</sup>及びR<sup>12</sup>はそれぞれ独立に、水素原子、ピバロイル基、カプリロイル基、ラウロイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、リノールオイル基、ドコサヘキサエノイル基、又はベンゾイル基であり、R<sup>13</sup>は、水素原子又はメチル基である)で表される化合物〔以下、本物質(II)と記す〕にも関する。なお、新規化合物である本物質(II)は、軟骨保護作用を有する本物質

(I)の一部であるので、本物質(I)に関する以下の説明は、該当する場合には本物質(II)にも当てはまる。

【0005】本物質(I)において、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>の好ましい例は、水素原子、アセチル基、ピバロイル基、カプリロイル基、ラウロイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、リノールオイル基、ドコサヘキサエノイル基、及びベンゾイル基であり、より好ましい例は、本物質(II)におけるR<sup>11</sup>及びR<sup>12</sup>、すなわち、水素原子、ピバロイル基、カプリロイル基、ラウロイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、リノールオイル基、ドコサヘキサエノイル基、及びベンゾイル基であり、本物質(I)及び(II)において更に好ましい例は水素原子、ピバロイル基、ステアロイル基及びベンゾイル基である。R<sup>3</sup>の好ましい例は水素原子及び炭素数1~4個の低級アルキル基であり、より好ましい例は本物質(II)におけるR<sup>13</sup>、すなわち水素原子又はメチル基である。

【0006】本物質(I)及び(II)としては、例えば、下記の化合物を例示することができる。エスクレチン、4-メチルエスクレチン、エスクレチン 6, 7-ビス(アセテート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(アセテート)、エスクレチン 6, 7-ビス(ピバレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ピバレート)、エスクレチン 6-モノピバレート、4-メチルエスクレチン 6-モノピバレート、エスクレチン 7-モノピバレート、4-メチルエスクレチン 7-モノピバレート、エスクレチン 6, 7-ビス(カプリレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(カプリレート)、エスクレチン 6, 7-ビス(ラウレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ラウレート)、エスクレチン 6, 7-ビス(パルミテート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(パルミテート)、エスクレチン 6, 7-ビス(ステアレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ステアレート)、エスクレチン 6, 7-ビス(リノレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(リノレート)、エスクレチン 6, 7-ビス(ドコ

(3)

サヘキサエノエート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ドコサヘキサエノエート)、エスクレチン 6, 7-ビス(ベンゾエート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ベンゾエート)

【0007】上記に例示した化合物のうち、エスクレチン 6-モノピバレート、エスクレチン 6, 7-ビス(ピバレート)、エスクレチン 6, 7-ビス(ステアレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ステアレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(リノレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ドコサヘキサエノエート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ベンゾエート)は、本物質(I)に属し、新規化合物である。

【0008】エスクレチン及び4-メチルエスクレチンは試薬として入手可能である。例えば、エスクレチンは東京化成工業株式会社から、4-メチルエスクレチンはシグマケミカルカンパニーから入手できる。

【0009】エスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンの各種カルボン酸モノ又はジエステルは、エスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンと各種カルボン酸とを下記の方法で反応させて得ることができる。

1) 適当な溶媒を用いて、塩酸、硫酸、磷酸等の無機酸或いは酢酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸のような酸触媒存在下に、エスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンとカルボン酸とを反応させる。

2) ジシクロヘキシルカルボジイミド、N, N'-カルボニルジ(2-メチルイミダゾール)、ジフェニルケテン-N-シクロヘキシルイミン、アルコキシアセチレン、ポリ磷酸エチルエステル、塩化チオニル、塩化オキサリル等の縮合剤の存在下に、ジメチルホルムアミド、アセトン、ジオキサン、アセトニトリル、クロロホルム、塩化エチレン、テトラヒドロフラン、ピリジン等の有機溶媒中で、エスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンとカルボン酸とを反応させる。通常冷却下ないし室温で行う。

3) 酸無水物とエスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンとをトリエチルアミン、ピリジン、メチルエチルピリジン等の塩基性物質存在下に反応させる。

4) 酸ハロゲン化物(ハロゲン化アシル:塩化物、臭化物等)とエスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンとをトリエチルアミン、ピリジン、メチルエチルピリジン等の塩基性物質を添加した溶媒中または塩基性溶媒例えばピリジン中で反応させる。

【0010】上記原料の使用割合によってモノエステル或いはジエステルを得ることができる。エスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンと等モル量ないし過剰量のカルボン酸、酸無水物、又は酸ハロゲン化物を使用するときはモノエステルを得、又それらを過剰量、通常モル比2以上を使用するときはジエステルを得ることができる。後者の場合、ジエステルとモノエステルの混

合物を得ることがある。この場合はクロマトグラフィー等の通常の分離法を用いることによりジエステルとモノエステルを容易に得ることができる。反応生成物の精製法としては、抽出、クロマトグラフィー、結晶化、再沈澱等を利用することができる。精製品の構造は、赤外線吸収スペクトル、紫外線吸収スペクトル、核磁気共鳴吸収スペクトル、元素分析、質量スペクトル等により確認することができる。

【0011】本物質(I)について毒性を調べた。本物質(I)の代表例を750mg/kg(体重)の量で、雄マウスに連続4日間腹腔内投与したが、死亡例はなく、特筆すべき毒性は見られなかった。本物質(I)はきわめて安全な化合物である(後記実施例2参照)。本物質(I)は、薬理効果として、培養軟骨細胞(家兎の肩、膝関節軟骨細胞)における軟骨破壊抑制作用を有する(後記実施例3参照)。従って、本物質(I)は、関節の軟骨破壊を伴う各種関節症の治療のための軟骨保護剤として有用である。このような関節症の例は、慢性関節リウマチ、変形性関節症、肩関節周囲炎、頸肩腕症候群、腰痛症等である。

【0012】本物質(I)を有効成分とする軟骨保護剤の製剤形態は、一般的な形態でよい。本物質(I)単独、又は、本物質(I)と製剤上許容し得る担体又は希釈剤との混合物の何れでも製剤として使用できる。製剤中の有効成分の量は、0.01~100重量%、好ましくは0.1~70重量%である。本発明の軟骨保護剤は、経口、非経口何れでも投与できる。本発明の軟骨保護剤の投与量は、対象(動物あるいはヒト)、年齢、個人差、病状等に依るので、下記範囲外量を投与する場合もある。しかしながら、一般にヒトを対象とする場合、本物質(I)の経口投与量は、1日当たり0.1~500mg/kg(体重)、好ましくは0.5~200mg/kg(体重)である。通常、1日量を、1回または2~4回に分けて投与する。

#### 【0013】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

#### 実施例1：本物質(I)又は(II)の合成

(1) エスクレチン 6, 7-ビス(アセテート)の合成

ナス型フラスコ(50ml)に、エスクレチン(東京化成; 890mg、5mmol)と4-(ジメチルアミノ)ピリジン(1.528g、12.5mmol)を入れた後、塩化メチレン(10ml)を加えて懸濁液とした。この懸濁液に、10℃でゆっくりと塩化アセチル(和光純薬; 918mg、12.5mmol)を滴下した。反応は発熱的であった。反応液を10℃で2時間攪拌すると、白色沈澱を生じた。塩化メチレン(25ml)を加えると、沈澱は完全に溶解した。反応終了を確

認した後、反応液に蒸留水(40ml)を加え、塩化メチレン(25ml×2)で抽出した。集めた有機層を蒸留水(20ml×1)で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去して、結晶性の粗生成物(1.265g)を得た。粗生成物をエチルアルコールから再結晶して、無色針状結晶として標記化合物(1.03g、収率78.6%)を得た。

融点: 133-133.5℃

TLC: R<sub>f</sub> 0.33 (n-ヘキサン/酢酸エチル 1:1)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 2.32 (s, 3H, Ac)、2.33 (s, 3H, Ac)、6.43 (d, 1H, J=9.62Hz, C3-H)、7.22 (s, 1H)、7.35 (s, 1H)、7.64 (d, 1H, J=9.62Hz, C4-H)  
IR (KBr, ν<sub>max</sub>): 1778s、1738s、1636m、1570m、1510m、1436m、1378m、1218s、1128s

【0014】(2) 4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(アセテート)の合成

4-メチルエスクレチン(シグマ)を原料にして上記(1)と同様の方法で標記化合物を合成した。黄色結晶として標記化合物を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.33 (s, 3H)、7.40 (s, 3H)、6.32 (s, 1H)、7.24 (s, 1H)、7.44 (s, 1H)

【0015】(3) エスクレチン 6, 7-ビス(ステアレート)の合成

ナス型フラスコ(50ml)に、エスクレチン(890mg、5mmol)と4-(ジメチルアミノ)ピリジン(1.528g、12.5mmol)を入れた後、塩化メチレン(20ml)を加えて懸濁液とした。この懸濁液に、10℃でゆっくりと塩化ステアロイル(東京化成; 3.787g、12.5mmol)を滴下した。反応液は白濁して固化した。そこで、塩化メチレン(20ml)を更に加えると、反応液は再び懸濁液となった。この懸濁液を室温で5時間攪拌した。反応終了を確認した後、反応液を氷水(20ml)に注ぎ、塩化メチレン(100ml×1)で抽出した。分離した有機層を蒸留水(20ml×1)で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去して、白色の粗生成物(3.91g)を得た。粗生成物を塩化メチレン/n-ヘキサンから再結晶して、白色粉末状結晶として標記化合物(2.773g、収率78.0%)を得た。

融点: 85-86℃

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 0.88 (t, 6H, CH<sub>3</sub>)、1.26 (m, 56H, CH<sub>2</sub>)、1.72 (m, 4H, CH<sub>2</sub>)、2.55 (q, 4H, CH<sub>2</sub>CO)、6.42 (d, 1H, C3-

H)、7.21 (s, 1H, aromatic)、7.33 (s, 1H, aromatic)、7.63 (d, 1H, C4-H)

【0016】(4) 4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス (ステアレート) の合成

4-メチルエスクレチンを原料にして上記(3)と同様の方法で標記化合物を合成した。白色結晶として標記化合物を得た。

融点: 121-122℃

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, δ ppm): 0.85 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.24 (m, 56H, CH<sub>2</sub>), 1.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.34 (s, 3H, C4-CH<sub>3</sub>), 2.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.18 (s, 1H, C3-H), 6.84 (s, 1H, aromatic), 7.42 (s, 1H, aromatic)

【0017】(5) 4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス (リノレート) の合成

塩化ステアロイルの代わりに塩化リノールオイル (東京化成) を用いて上記(4)と同様の方法で標記化合物を合成した。黄色油状物として標記化合物を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 0.90 (t, 6H), 1.2~1.4 (m, 32H), 1.4~2.0 (m, 4H), 2.0~2.2 (m, 8H), 2.4 (s, 1H), 2.8 (t, 4H), 5.3~5.5 (m, 8H), 6.3 (s, 1H), 7.2 (s, 1H), 7.4 (s, 1H)

【0018】(6) 4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス (ドコサヘキサエノート) の合成

塩化ステアロイルの代わりに塩化ドコサヘキサエノイル (東京化成; 塩化ドコサー4, 7, 10, 13, 16, 19-ヘキサエノイル) を用いて上記(4)と同様の方法で標記化合物を合成した。黄色油状物として標記化合物を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 0.95 (t, 6H), 2.10 (m, 4H), 2.2 (s, 3H), 2.4~2.7 (m, 8H), 2.7~3.0 (m, 12H), 5.3~5.7 (m, 24H), 6.3 (s, 1H), 7.2 (s, 1H), 7.4 (s, 1H)

【0019】(7) エスクレチン 6, 7-ビス (ベンゾエート) の合成

ナス型フラスコ (50ml) に、エスクレチン (890 mg, 5mmol) と4-(ジメチルアミノ)ピリジン (1.528 g, 12.5mmol) を入れた後、塩化メチレン (10ml) を加えて懸濁液とした。この懸濁液に、10℃でゆっくりと塩化ベンゾイル (東京化成; 1.757 g, 12.5mmol) を滴下した。直ちに、白色沈殿が生じたが、反応液を室温で4時間攪拌し

(5)

た。反応終了後、反応液を氷水 (20ml) に注ぎ、塩化メチレン (20ml×3) で抽出した。集めた有機層を蒸留水 (20ml×1) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去して、結晶性の粗生成物 (2.136 g) を得た。粗生成物を塩化メチレン/n-ヘキサンから再結晶して、白色粉末状結晶として標記化合物 (1.899 g, 収率98.4%) を得た。

融点: 183-184.5℃

10 TLC: R<sub>f</sub> 0.69 (n-ヘキサン/酢酸エチル 1:1)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 6.47 (d, 1H, J=9.62Hz), 7.38 (m, 6H, aromatic), 7.44 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.71 (d, 1H, J=9.62Hz), 8.04 (m, 4H, aromatic)

IR (KBr, ν<sub>max</sub>): 1765s, 1745s, 1625w, 1605w, 1570w, 1510m, 1475m, 1430m, 1390m, 1325w, 1255s

20 【0020】(8) 4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス (ベンゾエート) の合成

ナス型フラスコ (50ml) に、4-メチルエスクレチン (960mg, 5mmol) と4-(ジメチルアミノ)ピリジン (2.445 g, 20mmol) を入れた後、塩化メチレン (10ml) を加えて懸濁液とした。この懸濁液に、10℃でゆっくりと塩化ベンゾイル (2.811 g, 20mmol) を滴下した。直ちに、白色沈殿が生じたが、反応液を室温で4時間攪拌した。

30 反応終了後、反応液を氷水 (20ml) に注ぎ、塩化メチレン (20ml×3) で抽出した。集めた有機層を蒸留水 (20ml×1) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去して、結晶性の粗生成物 (2.250 g) を得た。粗生成物を塩化メチレン/n-ヘキサンから再結晶して、白色粉末状結晶として標記化合物 (1.960 g, 収率98.0%) を得た。

融点: 146-152℃

40 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 2.41 (d, 3H, J=2.0Hz), 6.34 (d, 1H, J=2.0Hz), 7.33~7.64 (m, 8H), 8.00 (d, 2H, J=2.6Hz), 8.09 (d, 2H, J=2.3Hz)

【0021】(9) エスクレチン 6, 7-ビス (ピバレート) (I) とエスクレチン 6-モノピバレート (II) の合成

ナス型フラスコ (50ml) に、エスクレチン (200 mg, 1.12mmol) とピリジン (3ml) を入れた。この混合物に0℃で、塩化ピバロイル (283.6 mg, 2.35mmol) を加えた後、室温で26時間

50

9  
 攪拌した。TLCで原料の消失と2つの生成物(Rf=0.8及び0.23, 塩化メチレン/メタノール=9:1)を確認した後、反応液を氷水(10ml)に注ぎ、エーテルで抽出した。集めた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮して、粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィーで分離精製した。塩化メチレンを用いて、第1流出分として標記化合物(I)(無色結晶、収率72%)と第2流出分として標記化合物(II)(無色結晶、収率25%)を得た。

標記化合物(I)

融点: 148-149℃

<sup>1</sup>H-NMR(90MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 1.35(s, 18H)、6.40(d, 1H, J=10.3Hz)、7.15(s, 1H)、7.29(s, 1H)、7.64(d, 1H, J=10.3Hz)

標記化合物(II)

融点: 159-162℃

<sup>1</sup>H-NMR(90MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 1.39(s, 9H)、6.26(d, 1H, J=9.5Hz)、6.98(s, 1H)、7.18(s, 1H)、7.60(d, 1H, J=9.5Hz)

【0022】実施例2: マウスを用いた連続4日腹腔内投与による毒性試験

6週齢のCrj:CD-1(ICR)雄マウス(1群5匹)に、エスクレチン或いはエスクレチン 6, 7-ビス(ベンゾエート)を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁した液を、1日1回連続4日間、腹腔内投与した。投与量は750mg/kgとした。いずれの化合物についても、死亡例はなく、特筆すべき毒性は見られなかった。

4-メチルエスクレチン、エスクレチン 6, 7-ビス(アセテート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(アセテート)、エスクレチン 6, 7-ビス(ステアレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ステアレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(リノレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ドコサヘキサエノエート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ベンゾエート)、エスクレチン 6, 7-ビス(ピバレート)及びエスクレチン 6-モノピバレートについても、同様の毒性試験を実施したが、死亡例は見られなかった。

【0023】実施例3: 培養軟骨細胞における軟骨破壊抑制作用

a) 培養軟骨細胞の調製

家兎(New Zealand White Rabbit)(体重1~1.5kg、北山ラベスより購入)の肩、膝関節より無菌的に軟骨を取り出した。これをPBS(Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>フリー)、ハンクス、及び0.1% EDTA-PBSでよく洗浄した後、約1mm角に刻ん

だ。これに、0.1% EDTA含有PBS(Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>フリー)を加え、37℃の恒温槽で30分間処理した。更に、トリプシン溶液(0.25%)で、37℃で、1時間処理し、軟骨に付着した結合組織を取り除いた。次に、上清を除去した後、軟骨を牛胎児血清(FBS)10%及びコラゲナーゼ0.2%を含有したHam F-12メディウム中で約2~2.5時間処理した。このコラゲナーゼ溶液を遠心分離(1500 rpm)した後、10%FBS含有ハムメディウム(軟骨メディウム)で2回洗浄し、最終的に軟骨細胞を、軟骨メディウムに細胞数3×10<sup>5</sup>個/mlの細胞濃度になるように調整した。この分散液を1mlずつ24穴プレートに播種し、4日後コンフルエントに達した後、2週間以内に実験に供した。

【0024】b) 被験物質及び軟骨破壊因子の添加

これまで軟骨細胞の培養に使用した軟骨メディウムを取り除き、新たに血清フリーのS-Cloneメディウム800μl(0.1%ヒト血清アルブミン含有)を加え、これに各濃度の被験物質100μl(最終濃度の10倍S-Cloneメディウム液、DMSO濃度2.5%)を加え、二酸化炭素(5%)と空気(95%)の存在下で2時間培養した後、軟骨破壊因子PMA(フォルボルミリステートアセテート)(最終濃度0.1μg/ml)或いはインターロイキン1α(IL-1α)(最終濃度20u/ml)を軟骨細胞培養液に加えた。

【0025】ここで使用した被験物質は以下の通りである。

本発明の化合物: エスクレチン(東京化成)、4-メチルエスクレチン(シグマ)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(アセテート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ステアレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(リノレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ドコサヘキサエノエート)、エスクレチン 6, 7-ビス(ベンゾエート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ベンゾエート)、エスクレチン 6, 7-ビスアセテート、エスクレチン 6, 7-ビス(ピバレート)、及びエスクレチン 6-モノピバレート(以上実施例1で合成した化合物)

比較物質: インドメタシン(シグマ)

【0026】c) GAGの定量

2日後、軟骨培養細胞上清を取り除いた後、残りの軟骨マトリックス層に、0.03%パパイン溶液1mlを加え、65℃で、1時間反応させ、マトリックス層からGAGを遊離させた。処理したパパイン溶液中のGAG含有量を1, 9-ジメチルメチレンブルー法を用いて定量した(定量法: R. W. Farndale, Biochim. Biophys. Acta., Vol. 883, pp. 173~177, 1986参照)。軟骨破壊因子無添加群(コントロール)の軟骨マトリックス中のGA

G含有量を100とした時の、各サンプルのGAG相対量を下記の式で求めた。コントロールのGAG含有量は、軟骨細胞がコンフルエントに達した後、実験に供するまでの経過日数の違いにより、ある幅(10.9~99.9  $\mu\text{g/ml}$ )を示した。

【0027】

【数1】GAG相対量% = (B/A) × 100

A: 軟骨破壊因子無添加群(コントロール)のGAG含有量

B: 軟骨破壊因子添加群又は(軟骨破壊因子+被験物質)添加群のGAG含有量

【0028】結果を表1~表5に示す。表中のGAG含有量は、平均値±標準誤差(n=3)の値である。各実験について、コントロール及び軟骨破壊因子添加群を入 \*

\*れた。有意差検定は、各実験の軟骨破壊因子添加群に対し、Student's t-testで行った。検定結果の表示は次の通りである。\*: P<0.05、\*: P<0.01、\*\*\*: P<0.001。軟骨破壊因子無添加群(コントロール)のGAG含有量に対して、軟骨破壊因子であるPMAやIL-1 $\alpha$ を添加することにより、GAGの減少が誘導された。この条件下で、本物質は、GAGの減少を抑制し、軟骨破壊抑制作用を有することが確認された。これに対して、従来の鎮痛抗炎症剤であるインドメタシンでは、軟骨破壊抑制作用は見られず、逆に軟骨破壊の促進作用が見られた。

【0029】

【表1】

サンプル名	GAG含有量 $\mu\text{g/ml}$	(GAG相対量%)
コントロール	72.1 ± 3.20 <sup>***</sup>	(100)
IL-1 $\alpha$	37.8 ± 2.21	(52.4)
+エスクレチン		
100 $\mu\text{M}$	63.9 ± 3.80 <sup>**</sup>	(88.6)
コントロール	58.8 ± 2.60 <sup>***</sup>	(100)
PMA	37.9 ± 1.37	(64.5)
+エスクレチン		
100 $\mu\text{M}$	78.0 ± 2.32 <sup>***</sup>	(133)
コントロール	99.9 ± 1.10 <sup>***</sup>	(100)
PMA	59.1 ± 0.80	(59.2)
+4-メチルエスクレチン		
100 $\mu\text{M}$	72.1 ± 0.70 <sup>***</sup>	(72.2)

【0030】

【表2】

サンプル名	GAG含有量 $\mu\text{g/ml}$	(GAG相対量%)
コントロール	20.3 ± 2.33 <sup>***</sup>	(100)
IL-1 $\alpha$	14.3 ± 2.57	(70.4)
+4-メチルエスクレチン		
6, 7-ビス(アセテート)		
100 $\mu\text{M}$	27.3 ± 3.66 <sup>*</sup>	(134)
コントロール	39.7 ± 0.55 <sup>**</sup>	(100)
IL-1 $\alpha$	33.0 ± 0.55	(83.1)
+4-メチルエスクレチン		
6, 7-ビス(リノレート)		
100 $\mu\text{M}$	37.3 ± 0.73 <sup>**</sup>	(94.0)
+4-メチルエスクレチン		
6, 7-ビス(ステアレート)		
100 $\mu\text{M}$	43.7 ± 0.37 <sup>***</sup>	(110)
+4-メチルエスクレチン		
6, 7-ビス(ドコサヘキサエノート)		
100 $\mu\text{M}$	43.0 ± 0.12 <sup>***</sup>	(108)
+4-メチルエスクレチン		
6, 7-ビス(ベンゾート)		
100 $\mu\text{M}$	44.7 ± 0.93 <sup>***</sup>	(113)
コントロール	10.9 ± 0.23 <sup>**</sup>	(100)
IL-1 $\alpha$	8.75 ± 0.23	(79.9)



+エスクレチン

6, 7-ビス (ベンゾエート)

100  $\mu$ M 9.54  $\pm$  0.15\* (87.5)

【0031】

【表3】

サンプル名	GAG含有量 $\mu$ g/ml	(GAG相対量%)
コントロール	24.3 $\pm$ 3.33**	(100)
PMA	11.3 $\pm$ 1.76	(46.5)
+4-メチルエスクレチン		
6, 7-ビス (アセテート)		
100 $\mu$ M	25.4 $\pm$ 3.84**	(105)
コントロール	44.3 $\pm$ 0.61**	(100)
PMA	37.9 $\pm$ 1.67	(85.6)
+4-メチルエスクレチン		
6, 7-ビス (リノレート)		
100 $\mu$ M	42.3 $\pm$ 0.82*	(95.5)
+4-メチルエスクレチン		
6, 7-ビス (ステアレート)		
100 $\mu$ M	47.0 $\pm$ 1.10**	(106)
+4-メチルエスクレチン		
6, 7-ビス (ドコサヘキサエノエート)		
100 $\mu$ M	47.6 $\pm$ 0.49**	(108)
+4-メチルエスクレチン		
6, 7-ビス (ベンゾエート)		
100 $\mu$ M	48.1 $\pm$ 1.56*	(109)

【0032】

【表4】

サンプル名	GAG含有量 $\mu$ g/ml	(GAG相対量%)
コントロール	24.0 $\pm$ 0.44**	(100)
1L-1 $\alpha$	16.0 $\pm$ 0.68	(66.7)
+エスクレチン		
6, 7-ビス (アセテート)		
100 $\mu$ M	20.9 $\pm$ 1.86	(87.1)
+エスクレチン		
6, 7-ビス (ピバレート)		
10 $\mu$ M	19.2 $\pm$ 1.58	(80.0)
+エスクレチン		
6-モノピバレート		
100 $\mu$ M	21.8 $\pm$ 2.19*	(90.8)

【0033】

【表5】

サンプル名	GAG含有量 $\mu$ g/ml	(GAG相対量%)
コントロール	28.0 $\pm$ 0.7**	(100)
PMA	15.4 $\pm$ 0.5	(55.0)
+インドメタシン		
10	13.2 $\pm$ 0.6*	(47.1)
33 $\mu$ M	11.7 $\pm$ 0.8**	(41.8)

【0034】

実施例4：製剤例 (顆粒剤)

エスクレチン

20重量部

乳糖

68重量部

低置換ヒドロキシプロピルセルロース

10重量部

ヒドロキシプロピルセルロー50

2重量部

を均一に混合した後、湿潤剤エタノール32重量部を用いて練合した。次いで湿式造粒を行い、乾燥して顆粒剤を得た。

【0035】

【発明の効果】本物質（I）は、軟骨マトリックスを構

\* 成するGAGの減少を強く抑制し、軟骨保護作用を示す。又、低毒性である。従って、本物質（I）は、軟骨保護剤として、慢性関節リウマチ、変形性関節症、肩関節周囲炎、頸肩腕症候群、腰痛症等の関節症の治療に極めて有用な用途を有する。

【手続補正書】

【提出日】平成6年4月25日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】エスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンの各種カルボン酸モノ又はジエステルは、エスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンと各種カルボン酸とを下記の方法で反応させて得ることができる。

1) 適当な溶媒を用いて、塩酸、硫酸、磷酸等の無機酸或いは酢酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸のような酸触媒存在下に、エスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンとカルボン酸とを反応させる。

2) ジシクロヘキシルカルボジイミド、N, N'-カルボニルジ(2-メチルイミダゾール)、ジフェニルケテン-N-シクロヘキシルイミン、アルコキシアセチレン、ポリ磷酸エチルエステル、塩化チオニル、塩化オキサリル等の縮合剤の存在下に、ジメチルホルムアミド、アセトン、ジオキサン、アセトニトリル、クロロホルム、塩化メチレン、テトラヒドロフラン、ピリジン等の有機溶媒中で、エスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンとカルボン酸とを反応させる。通常冷却下ないし室温で行う。

3) 酸無水物とエスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンとをトリエチルアミン、ピリジン、4-(ジメチルアミノ)ピリジン、又はジエチルメチルアミン等の塩基性物質存在下に反応させる。

4) 酸ハロゲン化物(ハロゲン化アシル：塩化物、臭化物等)とエスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンとをトリエチルアミン、ピリジン、4-(ジメチルアミノ)ピリジン、又はジエチルメチルアミン等の塩基性物質を添加した溶媒中または塩基性溶媒例えばピリジン中で反応させる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】上記原料の使用割合によってモノエステル或いはジエステルを得ることができる。エスクレチン或いは4-アルキルエスクレチンと等モル量ないし小過剰 ※50

※量のカルボン酸、酸無水物、又は酸ハロゲン化物を使用

10 するときはモノエステルを得、又それらを大過剰量、通常モル比2以上を使用するときはジエステルを得ることができる。後者の場合、ジエステルとモノエステルの混合物を得ることがある。この場合はクロマトグラフィー等の通常の分離法を用いることによりジエステルとモノエステルを容易に得ることができる。反応生成物の精製法としては、抽出、クロマトグラフィー、再結晶化、再沈澱等を利用することができる。精製品の構造は、赤外線吸収スペクトル、紫外線吸収スペクトル、核磁気共鳴吸収スペクトル、元素分析、質量スペクトル等により確認することができる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】(2) 4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(アセート)の合成

4-メチルエスクレチン(シグマ社製)を原料にして上記(1)と同様の方法で標記化合物を合成した。黄色結晶として標記化合物を得た。

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.33(s, 3H)、7.40(s, 3H)、6.32(s, 1H)、7.24(s, 1H)、7.44(s, 1H)

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

40 【0016】(4) 4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ステアレート)の合成

4-メチルエスクレチンを原料にして上記(3)と同様の方法で標記化合物を合成した。白色結晶として標記化合物を得た。

融点: 121-122℃

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO, δ ppm): 0.85(t, 6H, CH<sub>3</sub>)、1.24(m, 56H, CH<sub>2</sub>)、1.48(m, 2H, CH<sub>2</sub>)、1.64(m, 2H, CH<sub>2</sub>)、2.18(m, 2H, CH<sub>2</sub>)、2.34(s, 3H, C4-CH<sub>3</sub>)、2.57(m, 2H, CH<sub>2</sub>)、6.18(s, 1H, C3-

H)、6.84 (s, 1H, aromatic)、7.42 (s, 1H, aromatic)

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正内容】

【0023】実施例3：培養軟骨細胞における軟骨破壊抑制作用

a) 培養軟骨細胞の調製

家兎(New Zealand White Rabbit) (体重1~1.5kg、北山ラベスより購入)の肩、膝関節より無菌的に軟骨を取り出した。これをPBS(-) (Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>フリー)、ハanks、及び0.1%EDTA-PBS(-)でよく洗浄した後、約1mm角に刻んだ。これに、0.1%EDTA含有PBS(-)を加え、37℃の恒温槽で30分間処理した。更に、トリプシン溶液(0.25%)で、37℃で、1時間処理し、軟骨に付着した結合組織を取り除いた。次に、上清を除去した後、軟骨を牛胎児血清(FBS)10%及びコラゲナーゼ0.2%を含有したHam F-12メディウム中で約2~2.5時間処理した。このコラゲナーゼ溶液を遠心分離(1500 r.p.m.)した後、10%FBS含有Hamメディウム(軟骨メディウム)で2回洗浄し、最終的に軟骨細胞を、軟骨

メディウムに細胞数 $3 \times 10^5$ 個/mlの細胞濃度になるように調整した。この分散液を1mlずつ24穴プレートに播種し、4日後コンフルエントに達した後、2週間以内に実験に供した。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正内容】

【0025】ここで使用した被験物質は以下の通りである。

本発明の化合物：エスクレチン(東京化成)、4-メチルエスクレチン(シグマ社製)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(アセテート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ステアレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(リノレート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ドコサヘキサエノエート)、エスクレチン 6, 7-ビス(ベンゾエート)、4-メチルエスクレチン 6, 7-ビス(ベンゾエート)、エスクレチン 6, 7-ビスアセテート、エスクレチン 6, 7-ビス(ピバレート)、及びエスクレチン 6-モノピバレート(以上実施例1で合成した化合物)

比較物質：インドメタシン(シグマ社製)